

Опыт применения MTBDR plus в экспресс диагностике мультирезистентного туберкулеза

Т.Ш. Абилдаев , А.Х.Аленова, М.М Аденов, В.Л.Бисмилда, Ш.К.Игликова, Л.Т.Чингисова

Национальный центр проблем туберкулеза МЗ РК, г.Алматы, Казахстан

Туберкулез по-прежнему остается одной из актуальных проблем здравоохранения во всем мире. По данным ВОЗ, глобальная среднегодовая смертность, обусловленная туберкулезом, составляет около 2 млн. случаев.

В Республике Казахстан уровень заболеваемости по туберкулезу в 2010 г составил 95,3 на 100 тысяч населения и смертности 10,6 на 100 тысяч населения. Сложные социально-экономические условия жизни населения, миграция, увеличение числа штаммов, устойчивых к противотуберкулезным препаратам, являются одними из основных причин напряженной эпидемической ситуации в нашей стране. Следует отметить, что в последние годы темпы роста основных эпидемиологических показателей снизились. Однако тенденция к продолжению накопления резервуара инфекции остается и по настоящее время. Особо настораживает увеличение распространенности случаев заболевания с первичной лекарственной устойчивостью [1].

Во фтизиатрической практике до последнего времени туберкулез диагностируют на основании данных клинико-рентгенологических исследований с подтверждением роста *Mycobacterium tuberculosis* на плотных средах («золотой стандарт»), хотя известно, что *Mycobacterium tuberculosis* вырастают на них не раньше, чем через 4-6 недель. Применение автоматизированных систем с использованием жидких сред (ВАСТЕС MGIT 960 (Becton Dickinson) сокращает время выделения возбудителя до 3 – 4 суток.

Определение чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) к противотуберкулезным препаратам (ППП), в зависимости от применяемого метода, удлиняет время анализа еще на 1 - 3 недели. И, как правило, больным назначают противотуберкулезные препараты, независимо от того, каким штаммом они заражены, хотя подбор схемы лечения, учитывающей характер чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* у больного, в значительной степени определяет ее эффективность. Кроме того, известно, что 6,0 - 7,0% пациентов, у которых выявили *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью, умирают от лекарственной непереносимости и более чем у 16,0% из них развивается почечная недостаточность.

Таким образом, вопросы разработки и внедрения экспресс-методов детекции и определения лекарственной чувствительности МБТ, остаются одними из самых актуальных во фтизиатрии.

В последние годы, в связи с внедрением в практику фтизиатрии методов молекулярной биологии, которые отличаются быстротой анализа, высокой чувствительностью и специфичностью, выявление микобактерий и определение их генотипических характеристик значительно облегчает постановку диагноза и назначение больному адекватного лечения. На данный период времени расшифрован геном *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, который имеет длину 4411529 пар нуклеотидов и включает в себя примерно 4000 генов. Для ряда генов известны мутации, ответственные за изменение фенотипических свойств микобактерий, связанных с возникновением резистентности к противотуберкулезным препаратам. Установлено, что МБТ с различными типами мутаций требуют для предотвращения размножения разные дозы лекарственных препаратов.

В настоящее время известно, что резистентность к изониазиду определяется мутациями в 4 основных генах: *katG*, *inhA*, *ahpC/oxuR*, *kasA* и еще некоторых других, менее изученных: *fur A*, *ndh*. Более 95% случаев резистентности к рифампицину у больных туберкулезом обусловлено мутациями в коротком фрагменте (81 пара нуклеотидов) гена *groV*, кодирующего РНК-полимеразу МБТ

Цель исследования: изучить информативность метода MTBDR plus в выявлении мультирезистентного туберкулеза.

Задачами исследования явились :

1. сравнение экспресс метода MTBDR plus и ВАСТЕС MGIT-960 на основе исследования мокроты и культур МБТ.

2. валидации Hain-теста на основе сравнения результатов чувствительности двух методов MTBDR plus ВАСТЕС MGIT 960 при исследовании 20 штаммов из банка культур референс лаборатории, с установленной резистентностью к изониазиду и рифампицину (т.е. с МЛУ ТБ).

3. анализ результатов метода MTBDR plus у больных туберкулезом, обследованных по тяжести состояния, в экстренном порядке без предварительного установления бактериовыделения.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования был различный биологический материал (культура МБТ, мокрота, ликвор, бронхоальвеолярный смыв, гной из операционной раны, плевральная жидкость и т.д) от 670 больных туберкулезом, находившихся на лечении в Национальном центре проблем туберкулеза в период 2011- 2012 г.г.

Все экспресс методы бактериологической и молекулярно-генетической диагностики проводились согласно Методическим рекомендациям [2]

Результаты исследования

В соответствии с первой задачей нами проведено обследование 40 больных с впервые выявленным туберкулезом легких, находившихся на стационарном лечении в НЦПТ МЗ РК, двумя методами: экспресс-методом определения лекарственной чувствительности MTBDR plus и ВАСТЕС MGIT-960.

Из числа обследованных лиц с впервые выявленным туберкулезом легких мужчин было 28 (70,0%), женщин – 12 (30,0%). Наибольшее количество 27 (67,5%) обследованных больных были в возрасте от 20 до 29 лет. На стационарном лечении в НЦПТ данная категория больных находилась в среднем 95,4 к/дня. По клиническим формам туберкулеза больные распределялись следующим образом: инфильтративный туберкулез – 32 чел. (80,0%); фиброзно-кавернозный туберкулез – 8 чел. (20%). Причем у 10 (25,0%) больных отмечалось двустороннее специфическое поражение легких. Интерес представляло, что у двенадцати (30%) больных, типированных как ТБМЛУ НС заболевание было установлено впервые.

Осложнения специфического процесса были в виде: дыхательной недостаточности 6чел (15,0%), легочного кровотечения 2чел. (5%), легочно-сердечной недостаточности 2чел. (5%) чел. Сопутствующие заболевания: сахарный диабет первого 2чел. (5%) и второго 4 чел. (10%) типа.

Туб контакт не известен у 20 чел. (50%), известен в остальных случаях семейный) и родственный. С момента появления до установления диагноза прошло в среднем 1,8 мес (от 1 недели до 5 мес). У одного больного заболевание началось остро с легочного кровотечения. Заболевание выявлено по обращаемости у 36 (90,0%) больных. Больные изначально обращались к кардиологу, эндокринологу, окулисту с различными жалобами: повышением температуры, кашлем, болями в грудной клетке, жажду, похудание, снижение зрения. После проведения неспецифической антибактериальной терапии эффекта отмечено не было, в связи, с чем эти больные были дообследованы на предмет туберкулеза.

При поступлении у в клинику туберкулеза были установлены кашель с гнойно-слизистой мокротой (в некоторых случаях с трудно отделяемой) в 95,0% (38 чел.), потливость в ночное время в 52,5% (21 чел.), боли в грудной клетке в 55,0% (22 больных) случаев, повышение температуры тела до 38-39⁰С. В 46,7% (14 больных) случаев, одышка либо в покое, либо при физической нагрузке.

Почти у всех больных в 95% (38 больных) наблюдались : слабость, утомляемость, снижение массы тела в среднем на 6-7 кг в 50,0% (20 больных),а у 6 больных с сопутствующим диагнозом сахарный диабет, имелись жалобы : на сухость во рту, жажду, онемение рук и ног.

В общем анализе крови у данной категории больных отмечались: анемия 1-2 степени (10%), лейкоцитоз до 10x10⁹/л (35%), ускорение СОЭ до 26-65 мм/ч (57,5%), у 6 больных – лимфопения до 18%. У остальных больных изменений в общем анализе крови отмечено не было. В 100 % случаев у больных с впервые выявленным туберкулезом легких при бактериоскопии нативного мазка мокроты были обнаружены КУБ (от 2 КУБ до +++); бактериологическом посеве мокроты на МБТ на среду Левенштейна-Йенсена – от + до ++++, методом ВАСТЕС MGIT 960 – положительный рост.

Всем больным с впервые выявленным туберкулезом легких с положительным результатом бактериоскопии был проведен экспресс-метод диагностики лекарственной чувствительности МБТ к ПТП первого ряда MTBDR plus. Устойчивость к изониазиду и рифампицину выявлена у 12 (30,0%) больных. Чувствительность к рифампицину сохранена у 27 (67,5%) больных, к изониазиду - 28 (70,0%) больных (таблица 1).

Таблица 1 - Результаты обследования 40 больных впервые выявленных больных Hain-тестом (MTBDR plus)

Показатели ТЛЧ (R+H)	Результаты	
	Абс.ч.	%
Устойчивость к рифампицину	13	32,5%
Чувствительность к рифампицину	27	67,5%
Устойчивость к изониазиду	12	30,0%
Чувствительные к изониазиду	28	70,0%
МЛУ (рифампицин + изониазид)	12	30,0%
Чувствительность (рифампицин + изониазид)	27	67,5%

Полученные данные были верифицированы с результатами ВАСТЕС MGIT 960 и в частности было установлено, что монорезистентность определялась у 4-х(10%), полирезистентность - у 8 (20,0%), мультирезистентность - у 12 (30,0%) и сохраненная чувствительность - у 16 (40,0%) больных. Число лиц с МЛУ по результатам обоих тестов совпало и составляло 30,0% (12 больных).

У одного больного обоими методами MTBDR plus и ВАСТЕС MGIT 960 установлена резистентность только к рифампицину.

В соответствии со второй задачей осуществлена валидация Hain-теста, то есть проведено сравнение результатов чувствительности двух методов MTBDR plus ВАСТЕС MGIT 960 при исследовании 20 штаммов из банка культур референс лаборатории, были взяты штаммы с установленной резистентностью к к изониазиду и рифампицину (т.е. с МЛУ ТБ).

При сравнении результатов лекарственной чувствительности к рифампицину и изониазиду у данной категории больных двумя методами (методом ВАСТЕС и MTBDR plus) было выявлено, что совпадение по устойчивости к рифампицину и изониазиду наблюдалась в 100% случаев(таблица 2).

Таблица 2 - Результаты ВАСТЕС MGIT 960 и MTBDR plus на ТЛЧ к рифампицину и изониазиду

Показатели ТЛЧ	MGIT (n = 20)		MTBDR plus (n = 20)	
	Абс.ч.	%	Абс.ч.	%
Устойчивость к RIF	20	100,0	20	100,0
Устойчивость к INH	20	100,0	20	100,0

То есть имело место совпадение фенотипической и генотипической устойчивости.

Известно, что нарушения в зоне groV говорит об устойчивости к рифампицину, в зоне гена katG – о высокой устойчивости к изониазиду, а в зоне гена inhA – о низкой устойчивости к изониазиду. Представляло интерес изучение особенностей и частоты встречаемости мутаций в определенных локусах. Наиболее частые мутации наблюдались в 97,0% случаев в гене groV в локусе MUT 3 (S531L), в 100% случаев в katG MUT1 (S315T1), в 6,25% случаев в inhA MUT 1 (C15T) (таблица 3). Подобная тенденция определялась нами и ранее [3].

Таблица 3 – Частота встречаемости мутаций в генах к изониазиду и рифампицину методом MTBDR plus (n=33)

Препарат, локус	MUT 1	MUT 2A	MUT 2B	MUT 3
	Частота % и чел кол-во	Частота % и чел кол-во	Частота % и чел кол-во	Частота % и чел кол-во
Рифампицин groV	1 (3,3%) чел D516V			32 (97,0%) чел S531L
Изониазид katG	32 (100%) чел S315T1			
Изониазид inhA	2 (6,25%) чел C15T			

Интенсивность окраски полос на мембране и, соответственно, возможность объективной интерпретации результатов молекулярно-генетической диагностики существенно варьировала в зависимости от концентрации микобактерий. Лучшие результаты методы были (83,5%) достигнуты на образцах мокроты с высоким содержанием КУБ (2+, 3+), в то время как на образцах с меньшим количеством микобактерий (1+) интенсивность полос была несколько ниже.

В соответствии с третьей задачей проведен анализ результатов метода MTBDR plus у 88 больных туберкулезом обследованных по тяжести состояния, в экстренном порядке без предварительного установления бактериовыделения.

Последующий ретроспективный анализ клинико-микробиологических, морфологических данных свидетельствовал о возможности выявления туберкулеза и МЛЮ ТБ в 41,7% случаев у больных с костно-суставным туберкулезом при прямом исследовании операционного материала; в 14,1% случаев у больных туберкулезом легких при исследовании бронхо-альвеолярного смыва; в 7,1% при прямом тестировании плевральной жидкости у больных с экссудативным плевритом.

Ниже приведен клинический пример диагностики МЛЮ ТБ на основе Хайн теста - MTBDR plus.

Больная Ж., 30.05.86 года рождения, поступила в ЛТО 3 17.11.10 с жалобами на кашель с трудно отделяемой мокротой, слабость, потливость. Ранее туберкулезом не болела, контакт с больным туберкулезом отрицает. Данное ухудшение состояния четыре месяца назад (с июля), когда появились жалобы на кашель с мокротой, повышение температуры тела до

39⁰С. Обратилась в медицинский центр «Сункар», где по проведенной рентгенографии органов грудной клетки выставили диагноз пневмония и провели лечение неспецифическим антибиотиком (Цеф III) и симптоматическими препаратами в течение трех недель. При контрольном дообследовании в октябре месяце ухудшение, с подозрением на туберкулез направлена к фтизиатру. В РПТД Медеуского района при бактериоскопии мазка мокроты выявлены МБТ и выставлен диагноз Инфильтративный туберкулез верхней доли левого легкого МТ+, новый случай. I категория. Начато лечение по I категории и направлена на стационарное лечение в НЦПТ МЗ РК. Анамнез жизни: без особенностей.

Общее состояние относительно удовлетворительное, астенического телосложения. Периферические лимфатические узлы не увеличены. Кожный покров и видимые слизистые чистые, бледные. Обе половины грудной клетки симметрично участвуют в акте дыхания. При перкуссии отмечается притупление слева в верхних отделах. При аускультации там же дыхание ослабленное, выслушиваются влажные хрипы на высоте вдоха. Частота дыхания 20 в 1 минуту. Границы сердца в пределах нормы. Сердечные тоны ясные, ритмичные. Пульс 76 в 1 минуту. Артериальное давление 120/80 мм рт ст. Живот мягкий, безболезненный. Печень и селезенка не увеличены. Стул и диурез в норме. Со стороны нервной, костно-суставной системы патологии не выявлено.

В общем анализе крови от 18.11.10: Нб 113 г/л, Эр $4,32 \times 10^{12}/д$, Нт 29,6; Тромбоциты $7,9 \times 10^9/л$, п/я 8, с/я 56, моноциты 2, лимфоциты 34, СОЭ 2-4 мм/ч. В общем анализе мочи от 17.11.10: количество 110,0; цвет соломенно-желтый, прозрачность полная, удельный вес 1007, реакция кислая, белок отсутствует, плоский эпителий 3-5 ед в п/зр, переходный эпителий ед, лейкоциты 1-3 в п/зр, цилиндры восковидные 1-0-1, оксалаты +.

В биохимическом анализе крови от 18.11.10: билирубин 7,4 мкмоль/л; АлАТ 13,4 ммоль/л, тимоловая проба 3,54 ед, глюкоза 5,51 ммоль/л, мочевины 3,06 ммоль/л, белок 75 г/л. Бактериоскопия мазка мокроты от 10-11-11.11.10 №120 3+, 3+, 3+.

MTBDR plus от 13.02.11 (из культуры, выросшей на BACTEC MGIT 960): выявлена устойчивость к H и R.

Бак посев мокроты BACTEC MGIT 960 от 10.02.11 (на 3 мес лечения) 1+, ТЛЧ от 09.03.11 HRSZE – у, Am – ч, Cm – ч, Pto/Eto –у, OfI –ч.

На обзорной рентгенограмме органов грудной клетки, правой боковой рентгенограмме от 18.11.10: слева в верхней доле и проекции S6 определяется обширное затенение средней интенсивности с множественными полостями распада (в S2, S6), связанное широкой бронхососудистой дорожкой с расширенным левым корнем. В нижней доле очаги засева слабой интенсивности. Справа в легком легочный рисунок усилен, в проекции S3 – очаги засева. Синусы свободные, тень средостения без особенностей.

В связи с выявленной лекарственной устойчивостью МБТ к ПТП I ряда больная переведена в IV категорию DOTS и назначено лечение препаратами второго ряда. Для продолжения лечения переведена в ЛТО 1.

Сопоставляя результаты BACTEC и MTBDR plus, было выявлено, что результаты совпали полностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного нами исследования было установлено:

- что множественная лекарственная устойчивость МБТ у 40 впервые выявленных больных, выявленная MTBDR plus случаев в течение 2 дней, имела место в 30,0%. Эти результаты были подтверждены в 100% случаев BACTEC MGIT 960, но они были получены значительно позже, то есть в среднем от 20 до 35 дней.

- валидация Hain-теста с BACTEC MGIT при исследовании 20 штаммов из банка культур референс лаборатории свидетельствовала о совпадении фенотипической и генотипической устойчивости.

- наиболее частые мутации в ДНК МБТ наблюдались в 97,0% случаев в гене *rpoB* в локусе MUT 3 (S531L), в 100% случаев в *katG* MUT1 (S315T1), в 6,25% случаев в *inhA* MUT 1 (C15T).

- возможность выявления туберкулеза и МЛУ ТБ от 7,1% до 41,7% случаев у больных внелегочными формами туберкула при прямом исследовании операционного материала.

РЕЗЮМЕ

Т.Ш. Абилдаев, А.Х.Аленова, М.М Аденов, В.Л.Бисмилда, Ш.К.Игликова, Л.Т.Чингисова

Опыт применения MTBDR plus в экспресс диагностике мультирезистентного туберкулеза

В работе представлен опыт применения новейшей технологии - молекулярно-генетического метода MTBDR plus в диагностике МЛУ ТБ. Авторами на большом клиническом и биологическом материале от 670 больных туберкулезом проведена валидации теста и доказано, что метод высокочувствителен и не уступает по верификации МЛУТБ автоматизированной системе (BACTEC MGIT 960), а по скорости выявления значительно превосходит ее, так как дает возможность установить резистентность МБТ к противотуберкулезным препаратам уже через 2 дня. Анализ результатов применения молекулярно-генетического метода показал, что наиболее частые мутации наблюдались в 97,0% случаев в гене *rpoB* в локусе MUT 3 (S531L), в 100% случаев в *katG* MUT1 (S315T1), в 6,25% случаев в *inhA* MUT 1 (C15T). Показана возможность выявления туберкулеза и МЛУ ТБ от 7,1% до 41,7% случаев у больных внелегочными формами туберкула при прямом исследовании операционного материала.

SUMMARY

T.Sh. Abildaev, A.Kh. Alenova, M.M. Adenov, V.L. Bismilda, Sh.K. Iglíkova, L.T. Chigisova

Experience of MTBDR plus implementation in the rapid diagnostica of multidrug resistance

In this paper experience of implementing the innovative technology of molecular genetic method MTBDR for MDR TB diagnostics is presented. Validation of the test on the clinic and biological material from 670 patients with tuberculosis have been conducted and it has been proved that this method is of high sensitivity and it is equal by its effectiveness in MDR TB verification through automated system (BACTEC MGIT 960) use, while exceeds it by its speed of identification, because it gives the possibility to determine the resistance of MBT to anti-TB drugs 2 days later yet. Analysis of results of molecular genetic method implementation showed that the most frequent mutations were observed in 97.0% of cases in the *rpoB* gene of the locus MUT 3 (S531L), in 100% of cases in *katG* MUT1 (S315T1), in 6.25% of cases in *inhA* MUT1 (C15T). Peculiarity of TB and MDR TB detection has been showed in 7.1% to 41.7% of cases in patients with extrapulmonary TB forms at the direct investigation of surgical materials.

Тұжырым

Т.Ш.Әбілдаев, А.Х.Аленова, М.М.Аденов, В.Л.Бисмилда, Ш.К.Игілікова, Л.Т.Шыңғысова
Мультирезистентті туберкулезді жедел анықтау кезінде MTBDR plus әдісін қолданудың тәжірибесі.

Жұмыста көптеген дәріге төзімді туберкулезді анықтау үшін MTBDR plus әдісімен молекулярлық-генетикалық жаңа технологияны қолдану тәжірибесі келтірілген. Авторлар 670 туберкулез науқасының клиникалық және биологиялық материалдарында валидациялық тестісін жүргізген және жоғары сезімталдық әдісі дәлелденген, (BACTEC MGIT 960) автоматты жүйесі бойынша КДТ ТБ жол берілмейтіндігіне көз жеткізілген, ал жылдамдығын анықтау бойынша басымдылығы маңызды, өйткені 2 күннен кейін туберкулезге қарсы препаратқа ТМБ төзімділігін анықтауға мүмкіндік туады. Молекулярлық-генетикалық әдістің нәтижелерінде көбінесе мутация жиілігі MUT 3 (531L) локусында groV гендік жағдайда 97,%, katG MUT1 (S315T1) жағдайда 100%, inhA MUT1 (C15T) 6,25% жағдайда бақыланғаны көрсетілген. Тікелей операциялық зерттеу материалында туберкулездің өкпеден тыс түріндегі науқастардағы туберкулез және КДК ТБ анықтауда 7,1%-ден 41,7% дейін мүмкіндігі көрсетілген.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Статистический обзор по туберкулезу в Республике Казахстан, 2011. – 68 с.//Под ред. д.м.н., проф. Т.Ш.Абилдаев.
2. «Современные методы ускоренной бактериологической диагностики туберкулеза», Методические рекомендации. - 2012. – 40 с.. Абилдаев Т.Ш., Бисмилда В.Л., Аленова.А.Х. и др.
3. Аленова А.Х., Бисмилда В.Л.; Чингисова Л.Т., Игликова Ш.К. « Диагностика мультирезистентного туберкулеза молекулярно-генетическими методами» Актуальные вопросы борьбы с туберкулезом// Материалы Юбилейной сессии посвященной 90-летию ЦНИИТ РАМН. - Москва. – 2011. - С. 30-33